

# Membrane-Type Matrix Metalloproteinase(MT-MMP)Expression in Bone and Soft Tissue Tumors

著者	大井 英毅
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54822">http://hdl.handle.net/10097/54822</a>



博士論文

骨軟部腫瘍における膜型マトリックスメタロプロ  
テナーゼの局在および産生の検討

東北大学大学院医学系研究科外科系専攻

大井英毅



①

博士論文

骨軟部腫瘍における膜型マトリックスメタロ  
プロテナーゼの局在および産生の検討

東北大学大学院医学系研究科外科系専攻

大井英毅



## 要約

### matrix metalloproteinase-2

(MMP-2) はマトリックス分解酵素の一つで、主にⅣ型コラーゲンや変性したⅠ型コラーゲンを分解するとされており、悪性腫瘍の浸潤、転移や炎症、組織再構築等に際して重要な働きをしていると考えられている。

### membrane-type matrix

metalloproteinase (MT-MMP) は同様にMMPファミリーに属し、腫瘍細胞の膜表面に存在してMMP-2を活性化する働きを有している。本研究では、非上皮性腫瘍である骨軟部腫瘍のヒト手術材料を対象として、免疫組織化学的検討ならびに非放射性プローブを用いた*in situ* hybridizationを行い、これらMMP-2とMT-MMPの酵素の局在と産生を検討した。症例は、周囲組織への浸潤や遠隔転移をきたすような臨床的に悪性の腫瘍と、浸潤や遠隔転移を認めない良性病



変のコントロールの2群に分け、比較検討した。その結果、悪性群では腫瘍細胞と腫瘍浸潤マクロファージが、コントロール群では線維芽細胞がそれぞれ中心となってMMP-2、MT-MMPの2種類の酵素を産生していることが確認された。両群の臨床的性格の違いから判断すると、MMP-2が肉腫においては組織の破壊に関与し、肉芽組織等では組織の再構築に関与している可能性が強く示唆された。



## 研究背景

細胞外マトリックスとは、生体を構成する細胞と細胞の間をうめる蛋白成分である。その分解、すなわちマトリックス分解はマトリックス分解酵素の働きによりなされる。悪性腫瘍の浸潤、転移や炎症、外傷時の組織修復、個体発生などの際にこのマトリックスの分解という働きが重要な役割を果たしていることが知られてきている。このうち、悪性腫瘍の浸潤、転移については以下のことが提唱されてきた。

血行性転移をきたすような腫瘍の場合、腫瘍細胞は血管内皮細胞表面に達した後、各種コラーゲンやラミニン、フィブロネクチン等から構成される血管内皮基底膜という障壁を崩して組織内に侵入しなければならない。その血管内皮基底膜の主構成成分の一つであるⅣ型コラーゲンや、変性したⅠ型コラーゲン分解するマトリックス分解酵素として、



matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) が基底膜浸潤能を有する癌細胞から発見され、それ故腫瘍の浸潤、転移において重要な役割をはたしていると考えられている<sup>1)</sup>。

実験系のがん腫において、このMMP-2は、その酵素活性と腫瘍の転移能の間に非常に高い相関が認められている<sup>2) ~ 7)</sup>。そのためMMP-2の存在は悪性度の指標として考えられてきた<sup>8) ~ 17)</sup>。一方、ヒトの癌の手術標本を検討した最近の報告では、MMP-2のmRNAは主に間質細胞にシグナルが確認されている<sup>18) ~ 25)</sup>。この事実は、ヒト臨床材料では癌細胞が酵素を放出して浸潤、転移するという説だけでは説明しきれないことを示している。そこで、一つの仮説として、癌細胞から、間質の線維芽細胞や癌細胞に対する生体反応系として知られている腫瘍浸潤マクロファージ等へ向けて、なんらかのサイトカインが作用し、酵素の誘導が行われているの



ではないかとの考えがあり、現在研究が行われている<sup>26)、27)</sup>。

非上皮性腫瘍の浸潤、転移の機序においてもMMP-2が重要な役割を果たしていることが当然予測される。しかし、現在までその役割の内容はほとんど解明されていない。さらに、細胞内に貯留された状態のMMP-2はマトリックス分解能を有しておらず、細胞外に分泌された後に活性化される必要がある<sup>28)</sup>。しかし、その活性化の機序については明らかにされていなかった。最近になって、MMP-2と同様にMMPファミリーに属するmembrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) が、癌細胞の膜表面に存在し、MMP-2を活性化することが確認されている<sup>29)、30)</sup>。

このように、MMP-2とMT-MMPは、まず悪性腫瘍の浸潤、転移における働きが注目され、主に研究されてきた。しかし、先に述



べたように、現在ではこの悪性腫瘍の浸潤、転移のみならず、炎症や線維芽細胞等によるマトリックスの産生と組になって組織の再構築等にも関与していることが明らかとなってきた。



## 研究目的

本研究は、特に悪性腫瘍の浸潤、転移に際して重要な働きをしているとされてきた MMP-2 と MT-MMP の2種の酵素に着目し、非上皮性の悪性腫瘍である肉腫と、炎症や組織の再構築の例とでこれらの酵素の局在と発現を観察し、それらを相互に比較して生体内におけるこれらの酵素の働きを検討したものである。

### －検討の進め方－

- 1) 骨軟部腫瘍における MMP-2 および MT-MMP の局在を免疫組織化学的に観察し、両者の局在について産生細胞同定を行い、骨肉腫等の悪性腫瘍の群と肉芽組織等のコントロール群との差を検討する。
- 2) 骨軟部腫瘍における MMP-2 および MT-MMP の mRNA の発現を、*in situ* hybridization の技法を用いて観察する。  
また、この結果を免疫組織化学的検討の結果



と比較し、細胞レベルでの各酵素蛋白の mRNA の発現と局在の一致を観察する。

3) 組織の炎症や修復といった状況下での MMP-2 および MT-MMP の役割について、骨軟部腫瘍の場合と比較検討する。



## 研究方法

### - 標本 -

免疫組織化学的検討の対象とした症例は71例、*in situ hybridization*の対象とした症例は8例で、いずれも手術標本を用いた（表1）。局所での浸潤、破壊あるいは遠隔転移をきたす骨肉腫、悪性線維性組織球腫等を悪性群とし、炎症性肉芽組織、デスモイド等をコントロール群として分類し、比較検討の対象とした。

標本を摘出後、ただちに5×2×2mmの大きさに細切し、免疫染色に用いる標本は4% *periodate-lysine-paraformaldehyde* (PLP) で固定し、*in situ hybridization*に用いる標本は4% *paraformaldehyde* (PFA) + 0.5% *glutaraldehyde* (GA) / *phosphate buffer* (PB) で固定した。



- 免疫組織化学的検討 -

使用した抗体の詳細を表2に示す。

1. 通常の免疫染色

4%PLP固定のパラフィン包埋ブロックに対する酵素抗体間接法については、以下の手順で行った。

- 1) ミクロトームで $2.5\mu\text{m}$ に薄切
- 2) キシレンーエタノールラインで脱パラフィン
- 3) 精製水で洗浄後、正常血清ブロック（マウスモノクローナル抗体に対しては2%正常ヤギ血清/PBS+0.5%NaN<sub>3</sub>を使用）
- 4) 一次抗体と4℃で16時間反応
- 5) PBSで洗浄後、メタノール+0.3%  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で室温により15分間内因性ペルオキシダーゼブロック
- 6) PBSで洗浄後、二次抗体と4℃で16時間反応
- 7) PBSで洗浄後、3,3'-



diaminobenzidine (DAB) - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

溶液で5～15分間発色

8) 水洗、核染後、封入

## 2. 二重染色

細胞同定を目的として、マクロファージマーカーであるLeuM5、CD68とMMP-2、MT-MMPの抗体を用いて二重染色を行った。実験に際しては、一番目の反応をヒストファインのキットを使用し、二番目の反応は酵素抗体間接法で行った。

MMP-2とLeuM5の二重染色は、抗体の使用制限により凍結標本を用いた。はじめに4-chloro-1-naphtolでLeuM5を暗青色に発色し、続いてMMP-2をfast redで赤色に発色した。実際の実験の手技は、以下に示す手順に従って行った。

1) 10%ウサギ正常血清ブロック 30分

2) 1次抗体 (LeuM5) と4℃で16時間反



応

- 3) 0.03%  $H_2O_2$  / 0.05%  $NaN_3$  / PBS に  
より室温で10分間内因性ペルオキシダー  
ゼブロック
- 4) PBSで洗浄後、2次抗体と室温で40分間  
反応
- 5) PBSで洗浄後、酵素試薬と室温で30分  
間反応
- 6) PBSで洗浄後、クロルナフトール溶液で  
室温で10分間発色
- 7) 0.1 M グリシンHClバッファー (pH 2.2)  
で室温で15分間洗浄
- 8) 二回目の1次抗体 (MMP-2) と4℃で  
16時間反応
- 9) PBSで洗浄後、アルカリフォスファター  
ゼ標識2次抗体 (1:100) と4℃で8～  
10時間反応
- 10) PBSで洗浄後、fast red溶液で室温  
で10分間発色



11) PBSのバットで反応を止め、水溶性封入剤で封入

MT-MMPとCD68の二重染色はパラフィン包埋の標本を用いた。はじめにNi・Co増感DABでMT-MMPを灰青色に発色し、続いてnew fuchsinでCD68を赤色に発色した。実際の実験の手技は、以下に示す手順に従って行った。

1) 10%ウサギ正常血清ブロック 30分

2) 1次抗体 (MT-MMP) と4℃で16時間  
反応

3) 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.05% NaN<sub>3</sub> / PBSにより室温で10分間内因性ペルオキシダーゼブロック

4) PBSで洗浄後、2次抗体と室温で40分間  
反応

5) PBSで洗浄後、酵素試薬と室温で30分  
間反応

6) PBSで洗浄後、Ni-Co増感3,3'-



DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液で5分間発色

7) 精製水で洗浄後、0.1%トリプシン溶液

により37℃で15分間酵素処理

8) 二回目の1次抗体 (CD68) と4℃で16

時間反応

9) PBSで洗浄後、アルカリフォスファター

ゼ標識2次抗体 (1:100) と4℃で8～

10時間反応

10) PBSで洗浄後、new fuchsinで15

～20分間発色

11) 精製水で洗浄後、脱水、封入

#### *- in situ hybridization -*

標本を4%PFA+0.5%GA固定液にて8～

16時間固定後、ただちに脱水、パラフィン

包埋し、以下の手順でMMP-2<sup>31)</sup>、MT-

MMP<sup>29)</sup>、 $\alpha$  I procollagen<sup>32)</sup> に対する

ジゴキシゲニン標識RNAプローブを用いた

*in situ hybridization*を行った。



- 1) 脱パラフィン
- 2) クエン酸バッファー内で95℃で15分間  
マイクロウェーブ処理
- 3) proteinase K (20  $\mu$ g/ml PBS) で  
37℃で30分間処理
- 4) PBSで洗浄
- 5) 4% PFA/PBSで室温で5分間後固定
- 6) グリシンバッファー (2 mg/ml) で10  
分間、2回洗浄
- 7) 50%脱イオン化FA/2×SSCに保存し、  
ハイブリダイゼーション液作製 (表3)
- 8) 90℃で5分間処理し、氷中で急冷
- 9) 45℃で16時間ハイブリダイゼーション
- 10) 50% FA/2×SSCで45~48℃で60  
分間洗浄
- 11) 10 mM Tris HCl (pH 7.5~8.0)  
/500 mM NaClで5分間、2回洗浄
- 12) RNase (20  $\mu$ g/ml in 2×SSC)  
で37℃で30分間処理



13) 50% FA / 2×SSC で 45～48℃ で 60  
分間洗浄

14) 50% FA / 1×SSC で 45～48℃ で 60  
分間洗浄

15) 50% FA / 1×SSC で 45～48℃ で 60  
分間洗浄

16) PBS で 3 回洗浄

17) 0.5% ブロッキング液 / PBS で 反応停止

18) ALP 標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1 :  
500) と 4℃ で 16 時間反応

19) 0.3% Tween 20 / TBS で 3 回洗浄

20) 100mM Tris HCl buffer (pH  
9.5) / 100mM NaCl / 50mM MgCl<sub>2</sub> で  
pH 調整

21) 発色液滴下

4-nitro blue tetrazolium chloride、5 μg/ml

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate、

3.75 μg/ml

これを 20) に溶かし、発色液として使用



- 22) PBSで反応停止
- 23) 水洗
- 24) 10% フォルマリンで15分間固定
- 25) 水洗
- 26) 抽出メチルグリーンで核染
- 27) 軽く水洗
- 28) 風乾
- 29) 脱水、封入



## 結果

### - 免疫組織化学的検討 -

免疫染色の結果を表4に示す。

1) MMP-2は、悪性群、コントロール群の両方に存在が確認された。

骨肉腫の例に対して行った免疫染色では腫瘍細胞と、比較的小型で表面に突起を有する細胞が陽性となり、染色の強度は後者の方が優った(図1)。悪性線維性組織球腫の例に対して行った免疫染色では、腫瘍中の細胞が広汎に陽性となったが、腫瘍細胞と反応性細胞の区別は形態からは困難であった。骨肉腫の例に対して行ったLeuM5とMMP-2の抗体を用いた二重染色では、LeuM5陽性でマクロファージと考えられた比較的小型で表面に突起を有する細胞とLeuM5陰性の腫瘍細胞でMMP-2が陽性であった(図2)。

肉芽組織およびデスモイドの例では、血管内皮細胞、中膜平滑筋の一部、およびコラー



ゲン線維束に囲まれた紡錘型の細胞に MMP-2 の陽性像が認められた。コラーゲン線維束中の紡錘型の細胞は、その形態と、二重染色の結果において LeuM5 が陰性であることから、線維芽細胞と判断された（図3、4）。さらに、デスモイドの例では、マクロファージの一部のみで MMP-2 が陽性であった。

2) MT-MMP も肉腫群、コントロール群ともにその存在が確認され、局在は MMP-2 のそれとほぼ一致した。ただし、MT-MMP 陽性細胞の分布は MMP-2 よりも密の傾向が認められ、特に肉腫群では MMP-2 陰性の細胞の領域にも、MT-MMP 陽性の細胞が認められた（図5）。コントロール群では、次に述べる I 型プロコラーゲン、MMP-2、MT-MMP の三者の局在する細胞の形態、および分布がほぼ一致した（図6）。

MT-MMP の抗体と CD68 を用いた二重染



色法による、MT-MMP陽性細胞の同定に関しては、前述のMMP-2とLeuM5を用いた二重染色と同様の結果が得られた。しかしコントロール群においてMT-MMPが陽性となったマクロファージの割合は、MMP-2が陽性となったマクロファージの割合よりも高い傾向が見られた（図7、8）。

3）I型プロコラーゲンは、肉腫群では細胞外マトリックス中に瀰漫性に散在し、一部腫瘍内の小型の細胞にも陽性像が得られた。コントロール群では、コラーゲン線維束中に存在する線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞と血管内皮細胞に陽性像が得られ、MMP-2の場合とほぼ一致した（図3、6）。

4）MMP-2による破壊の直接の標的とされるIV型コラーゲンは、血管基底膜にその存在が限局しており、肉腫群とコントロール群との間に差が認められなかった（図9）。



- *in situ* hybridization -

両群において認められた各 mRNA の発現の有無を表5に示す。

1) MMP-2 の mRNA は、骨肉腫の例では、核異型のみられる腫瘍細胞よりも、むしろその周囲の小型の細胞に強く発現する傾向が見られた。通常の免疫染色と二重染色の結果から、これらの小型の細胞は主に腫瘍浸潤マクロファージであると考えられた。

肉芽組織の例では線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞と、血管内皮細胞の一部にシグナルが検出された。これらの結果はいずれも免疫染色の結果と一致する所見であった。

2) MT-MMP の mRNA は、骨肉腫の例では、HE 染色で腫瘍細胞と判断される異型性の明瞭な細胞に強いシグナルが見られ、周囲の反応性細胞にはあまり強いシグナルは認められなかった。これは MMP-2 の *in situ* hybridization の結果と反対の所見であっ



た。

肉芽組織の例では、線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞と、血管内皮細胞の一部にシグナルが検出された。この結果はMMP-2の*in situ* hybridizationの結果とほぼ一致した。

3) I型プロコラーゲンのmRNAは、骨肉腫の例では、マトリックス中の小型の細胞に発現が認められた。MMP-2のmRNAのシグナルとの一致は確認されなかった。

肉芽組織の例では、コラーゲン線維束に囲まれた紡錘形細胞に発現が認められ、発現のパターンがMMP-2の場合と類似していた。

(図10、11)。肉芽組織ではI型プロコラーゲン、MMP-2、MT-MMPのmRNAの発現がほぼ一致したことになる。免疫染色の結果から、これらのシグナルが検出された細胞は線維芽細胞と判断された。



## 考察

最近10年ほどの間に9種類のMMPファミリーの分子構造が同定されている。中でもMMP-2は癌の浸潤、転移に関して重要な役割を果たしていると考えられて、様々な腫瘍でその局在や産生が研究されてきた<sup>8)~17)</sup>。しかし臨床的性格に着目してこのMMP-2の発現を観察した研究は数が少ない<sup>24)、25)</sup>。*in situ hybridization*を用いた研究によると、癌では間質中の細胞（線維芽細胞、血管内皮細胞など）にMMP-2のmRNAの発現が認められており、癌細胞にMMP-2の局在が認められた免疫組織化学的検討の結果と若干の食い違いが生じている<sup>19)~21)、23)</sup>。本研究では、免疫染色の結果と*in situ hybridization*の結果がほぼ一致し、MMP-2産生細胞が自身の内部にその酵素蛋白を貯蔵し、必要に応じて分泌しているものと考えられる。



MT-MMPは1994年に清木ら<sup>29)</sup>によってその分子構造が同定された分子量66kDの膜貫通型蛋白で、そのC-末端に膜貫通ドメインを有している。この膜貫通ドメインを介して細胞膜に結合し、N-末端側の細胞外ドメインがMMP-2と結合することにより、MMP-2を活性化する。MT-MMPはマトリックス中に遊離した状態では酵素活性を有しないため、細胞が放出するMMP-2を、MMP-2産生細胞自身の膜表面で活性化していると考えられている<sup>28)、30)</sup>。

Bassetらのグループ<sup>33)</sup>は、種々の癌でMT-MMPが免疫組織化学的に癌細胞中に局在するが、かえってmRNAの発現は間質中の細胞に認められ、癌細胞では認められなかったことから、これらの間質中の細胞が産生したMT-MMPがなんらかの方法で癌細胞の膜表面に結合するのではないかと推測している。本研究ではこの報告と同様の結果が得ら



れたが、肉腫細胞にもmRNAの発現が認められた。これは上皮性腫瘍と間葉系腫瘍の性格の差による可能性がある。ただし、*in situ hybridization*の固定法の違いも無視することはできない。我々の別の検討<sup>21)</sup>では、非放射性プローブを用いた*in situ hybridization*用には、今回用いたPFA+GAによる固定が最も良好なシグナルが検出できるという結論を得ている。

今回行った免疫組織化学的検討および*in situ hybridization*の結果から、骨軟部腫瘍や炎症においてMT-MMP、MMP-2がともに産生されていることが証明された。しかしその発現のパターンは悪性群と非腫瘍性病変であるコントロール群との間に差異が認められた。すなわち、MMP-2に関しては、悪性群の骨肉腫等では主にマクロファージと腫瘍細胞が産生しているのに対し、コントロール群の肉芽組織等では線維芽細胞が主体と



なって産生していることが確認された。これは肉腫における腫瘍浸潤マクロファージの活性の高さを反映しているものと考えられる<sup>34)</sup>。これらのマクロファージの産生するMMP-2と腫瘍細胞自体の産生するMMP-2が共同して、組織の破壊に関与しているものと思われる。

コントロール群のMMP-2の局在ならびに産生は、I型プロコラーゲンの局在ならびに産生と関連があるという結果が得られた。変性したI型コラーゲンはMMP-2によって分解されんとする報告<sup>35)</sup>を考慮すると、炎症などによる肉芽組織等においては、マトリックス蛋白の産生と分解がともに亢進しており、MMP-2が組織の再構築に関与している可能性が示唆された<sup>36)~38)</sup>。

MT-MMPの局在はMMP-2のそれとかなり類似しているが、全体としてMT-MMPの方が優位に発現していた。この結果は



Bassetらの報告と一致している。悪性群の肉腫で、特にその傾向が顕著であった。このことから、肉腫では肉腫細胞とマクロファージ等がMT-MMPを次々と産生することにより、活性化型MMP-2の産生を促していると推測される。また、MMP-2とMT-MMPのmRNAの発現が、肉腫細胞とマクロファージ等でその強さが逆になっていたことは、腫瘍細胞が他の細胞から分泌されたMMP-2を自身の膜表面上で活性化して組織の破壊に利用しているという考えに一致する。

Larjavaらのグループ<sup>39)</sup>は炎症の治癒過程におけるMMP-2の量はその時期によらずほぼ一定であると報告している。今回の観察では、肉芽組織等に免疫染色で確認された局在とほぼ一致してmRNAが発現していた。このことから、組織中にはほぼ一定量のMMP-2が産生、そして貯留されており、組織再構築や破壊の際に必要な応じてMT-



MMPによって活性化されると推測できる。  
すなわち、炎症や組織の破壊、特に腫瘍の浸潤など、生体反応が賦活化された状況では、活性化型MMP-2の存在が必要なため、それに先駆けてMT-MMPが発現し、そのために結果的にMT-MMPが優位に発現しているように見えるものと考えられる。炎症性肉芽組織でも、血管新生の著明な炎症の激しい部位ではMMP-2、MT-MMPともに陽性細胞数が多い。これは組織中の細胞の活性の高さを反映しているものと考えられる。言い換えれば、もともと間葉系由来の正常組織中にもturn over enzymeとしてMMP-2は存在しており、炎症で線維芽細胞などの反応性の細胞の活性化がマトリックス分解と産生のバランスを保ちつつ亢進しているのに対し、腫瘍では腫瘍細胞とマクロファージなどの反応性細胞の両方の活性化により、分解と産生のバランスが崩れて組織の破壊に傾いた状態になっ



ていると考えられる。



## 結 論

- 1) 骨軟部腫瘍や非腫瘍性病変においては、臨床的な性格の違いによらず MMP-2、MT-MMP が産生されていた。
- 2) 悪性群においては、腫瘍細胞と腫瘍浸潤マクロファージが MMP-2 を産生していた。
- 3) MT-MMP と MMP-2 の局在に関連が認められ、組織の破壊、再構築等 MMP-2 が必要とされる場合は、MT-MMP が MMP-2 の活性化を促進している可能性が示唆された。
- 4) 骨肉腫の例では、特に異型性の強い肉腫細胞に I 型プロコラーゲンの産生を欠いた MT-MMP の産生が認められた。これに対し、コントロール群において I 型プロコラーゲンと MMP-2、MT-MMP の局在に類似性が得られた。これは、MMP-2 の turn over enzyme としての役割をも裏付けるものと思われる。
- 5) MMP-2 は、肉芽組織等では組織の再構



築に、骨肉腫等では組織破壊に関与するという二面性を有している可能性がある。



## 文献

- 1) L. A. Liotta. (1986) Tumor invasion and metastases -role of the extracellular matrix. *Cancer Res*, 46(1),1-7.
- 2) T. Salo, L. A. Liotta and K. Tryggvason. (1983) Purification and characterization of murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem*, 258(5),3058-63.
- 3) M. Nakajima, D. R. Welch, P. N. Belloni et al. (1987) Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potential. *Cancer Res*, 47(18),4869-76.
- 4) V. P. Terranova, E. S. Hujanen, D. M. Loeb et al. (1986) Use of a reconstituted basement membrane to measure cell



invasiveness and select for highly invasive tumor cell. Proc Natl Acad Sci U S A, 83(2),465-9.

5) V. Shah, S. Kumar and K. A. Zirvi. (1994) Metastasis of human colon tumor cells in vivo: correlation with the overexpression of plasminogen activators and 72 kDa gelatinase. In Vivo, 8(3),321-6.

6) H. T. Turpeenniemi, U. P. Thorgeirsson, I. R. Hart et al. (1985) Expression of collagenase IV (basement membrane collagenase) activity in murine tumor cell hybrids that differ in metastatic potential. J Natl Cancer Inst, 75(1),99-103.

7) H.Azzam, S.Arand, G.Lippman, M. E. Thompson. (1993) Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. J



Natl Cancer Inst, 85(21),1758-64.

8) T. Irimura, T. Yamori, S. C. Bennett et al.

(1987) The relationship of collagenolytic activity to stage of human colorectal carcinoma. Int J Cancer, 40(1),24-31.

9) E. Campo, M. J. Merino, L. Liotta et al.

(1992) Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. Hum Pathol, 23(12),1395-401.

10) B. Davies, J. Waxman, H. Wasan et al.

(1993) Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res, 53(22),5365-9.

11) B. M. Emmert, M. J. Roth, Z. Zhuang et al.

(1994) Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. Am J Pathol, 145(6),1285-90.



- 12) B. W. Ennis and L. M. Matrisian. (1993) Matrix degrading metalloproteinases. J Neurooncol, 18(2),105-9.
- 13) M. Hoyhtya, R. Fridman, D. Komarek et al. (1994) Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase 2 and its specific inhibitor TIMP-2 in neoplastic tissues with monoclonal antibodies. Int J Cancer, 56(4),500-5.
- 14) J. Kusakawa, Y. Sasaguri, I. Shima et al. (1993) Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. Am J Clin Pathol, 99(1),18-23.
- 15) Y. Mori, H. Mizuuchi, K. Sato et al. (1994) [The factors involved in invasive ability of endometrial carcinoma cells]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi,



46(6),509-16.

16) H. Nakagawa and S. Yagihashi. (1994)  
Expression of type IV collagen and its  
degrading enzymes in squamous cell  
carcinoma of lung. Jpn J Cancer Res,  
85(9),934-8.

17) I. Shima, Y. Sasaguri, J. Kusakawa et  
al. (1992) Production of matrix  
metalloproteinase-2 and  
metalloproteinase-3 related to malignant  
behavior of esophageal carcinoma. A  
clinicopathologic study. Cancer,  
70(12),2747-53.

18) S. T. Gray, R. J. Wilkins and K. Yun.  
(1992) Interstitial collagenase gene  
expression in oral squamous cell  
carcinoma. Am J Pathol, 141(2),301-6.

19) R. Poulson, M. Pignatelli, S. W. Stetler  
et al. (1992) Stromal expression of 72 kDa



type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. Am J Pathol, 141(2),389-96.

20) C. Pyke, E. Ralfkiaer, K. Tryggvason et al. (1993) Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. Am J Pathol, 142(2),359-65.

21) H. Ohtani, T. Nagai and H. Nagura. (1995) Similarities of in situ mRNA expression between gelatinase A (MMP-2) and type I procollagen in human gastrointestinal carcinoma: Comparison with granulation tissue reaction. Jpn.J.Cancer Res. 86,833-39.

22) H. Sato, Y. Kida, M. Mai et al. (1992) Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases



in various human tumor cells. *Oncogene*, 7(1),77-83.

23) W. F. Grigioni, A. D'Errico, M.

Fiorentino et al. (1994) Gelatinase A (MMP-2) and its mRNA detected in both neoplastic and stromal cells of tumors with different invasive and metastatic properties. *Diagn Mol Pathol*, 3(3),163-9.

24) Y. Soini, T. Salo, A. Oikarinen et al.

(1993) Expression of 72 kilodalton and 92 kilodalton type IV collagenase in malignant fibrous histiocyctomas and dermatofibromas. *Lab Invest*, 69(3),305-11.

25) H. Autio-Harmainen, T. Karttunen,

T. Hurskainen et al. (1993) Expression of 72 kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest*, 69(3),312-21

26) C. M. Overall, J. L. Wrana and J.



Sodek. (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. J Biol Chem, 266(21),14064-71.

27) T. J. Rawdanowicz, A. L. Hampton, H. Nagase et al. (1994) Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. J Clin Endocrinol Metab, 79(2),530-6.

28) J. Cao, H. Sato, T. Takino et al. (1995)



The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. J Biol Chem, 270(2),801-5.

29) H. Sato, T. Takino, Y. Okada et al. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature, 370(6484),61-5.

30) A. Y. Strongin, I. Collier, G. Bannikov et al. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. J Biol Chem, 270(10),5331-8.

31) P. Huhtala, R.L. Eddy, Y.S. Fan et al. Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. (1990) Genomics, 6,554-9.



32) M-L. Chu, J.C. Myers, M.P. Bernard. (1982)  
Cloning and characterization of five  
overlapping cDNAs specific for the human  
pro  $\alpha$  1(I) collagen chain. Nucleic Acids  
res. 10, 5925-34.

33) A. Okada, J.P. Bellocq, N. Rouyer. et al.  
Membrane-type matrix metalloproteinase  
(MT-MMP) gene is expressed in stromal  
cells of human colon, breast, and head and  
neck carcinomas. (1995)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2730-34

34) T. Tsuchiya, K. Takahashi, M. Takeya et  
al. (1993) Immunohistochemical,  
quantitative immunoelectron microscopic,  
and DNA cytofluorometric characterization  
of chemically induced rat malignant fibrous  
histiocyoma. Am J Pathol, 143(2), 431-45.

35) G. Murphy and A. J. Docherty. (1992)  
The matrix metalloproteinases and their



inhibitors. Am J Respir Cell Mol Biol,  
7(2),120-5.

36) M. S. Agren. (1994) Gelatinase activity  
during wound healing. Br J Dermatol,  
131(5),634-40.

37) E. C. Bullen, M. T. Longaker, D. L.  
Updike et al. (1995) Tissue inhibitor of  
metalloproteinases-1 is decreased and  
activated gelatinases are increased in  
chronic wounds. J Invest Dermatol,  
104(2),236-40.

38) M. E. Fini, M. T. Girard and M.  
Matsubara. (1992)  
Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in  
corneal wound healing. Acta Ophthalmol  
Suppl, 1992(202),26-33.

39) T. Salo, M. Makela, M. Kylmaniemi et  
al. (1994) Expression of matrix  
metalloproteinase-2 and -9 during early



human wound healing. Lab Invest,  
70(2),176-82.



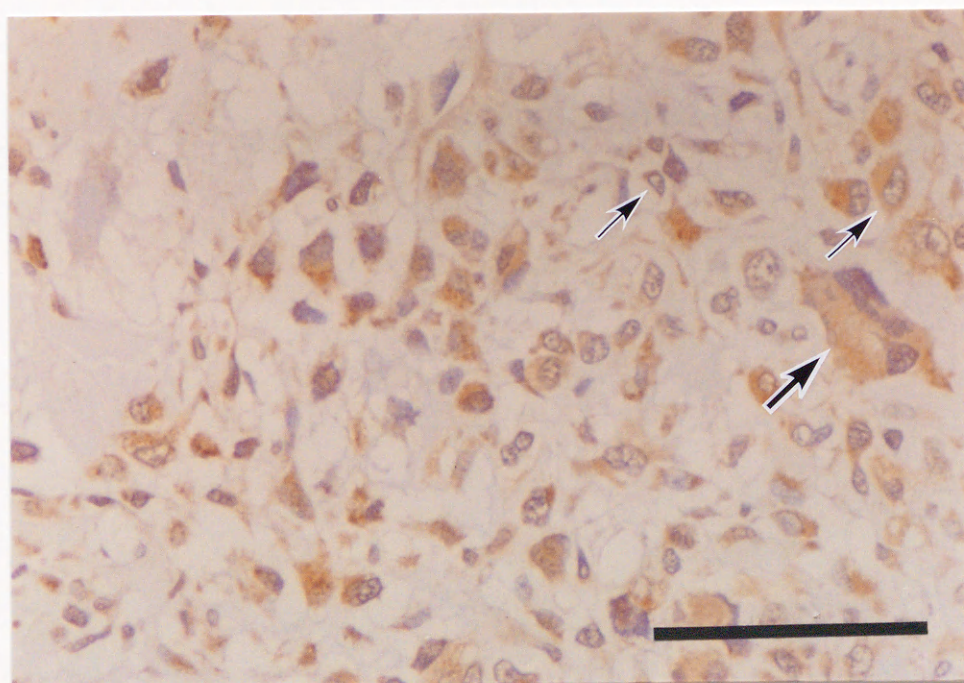
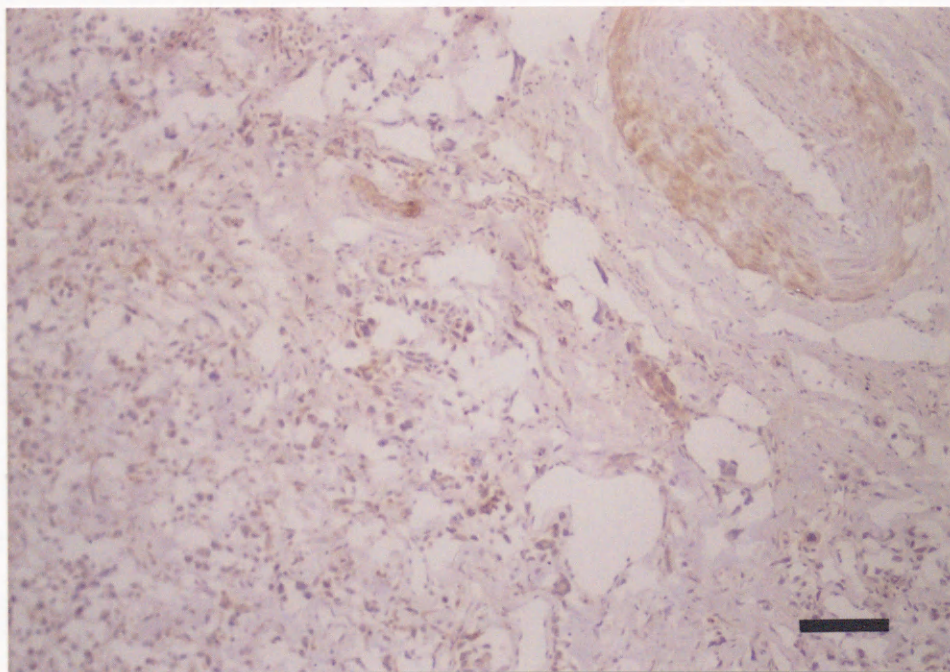


図1 骨肉腫、MMP-2

腫瘍中の細胞と血管中膜平滑筋の一部に陽性像が得られる。強拡大では核異型の明らかな肉腫細胞（矢印；大）よりも、周囲の小型で円形ないし表面に突起を有する細胞（矢印；小）に強く陽性像が観察される。（barは100 $\mu$ m）



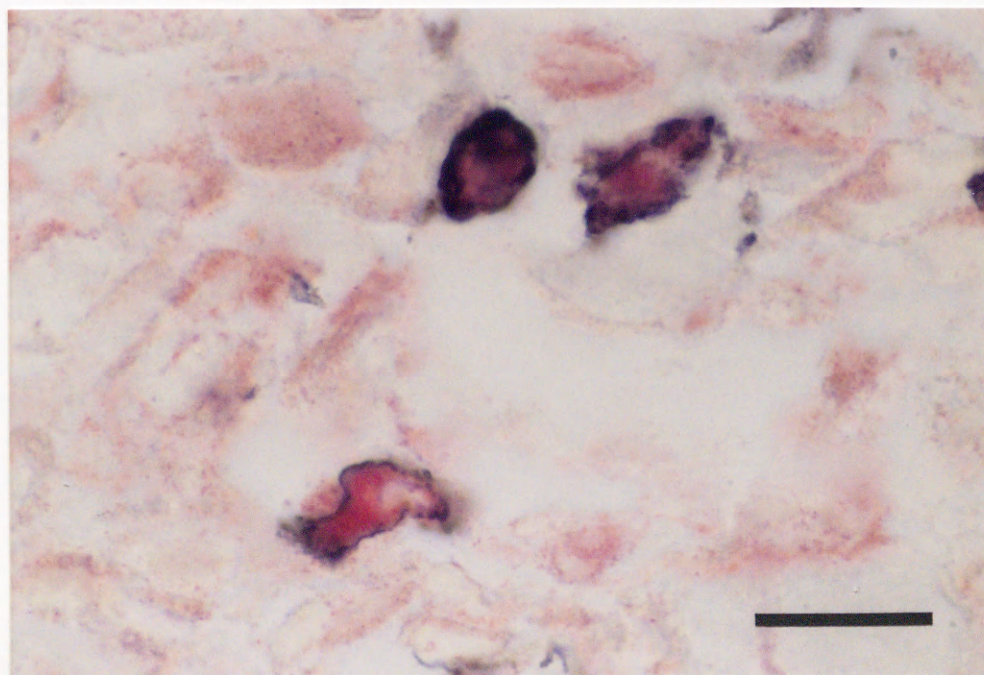
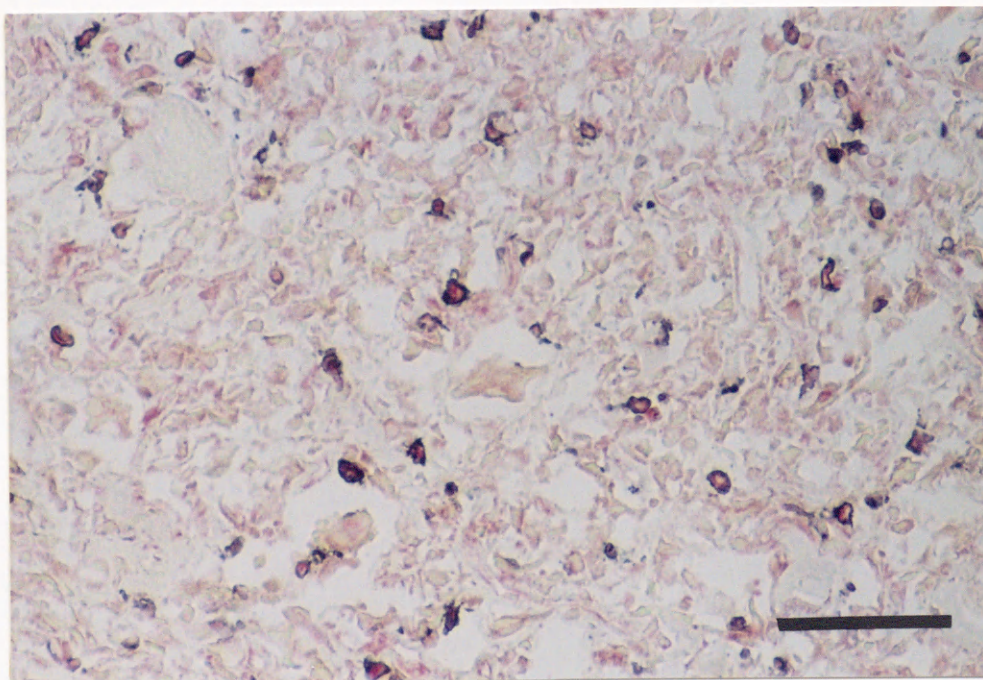


図2 骨肉腫、二重染色（MMP-2：赤、LeuM5：黒青）

LeuM5陽性細胞（マクロファージ）はその大部分がMMP-2陽性となっている。MMP-2の染色強度はマクロファージの方が強い点に注目。（barは写真上段が100  $\mu$ m、下段が20  $\mu$ m）



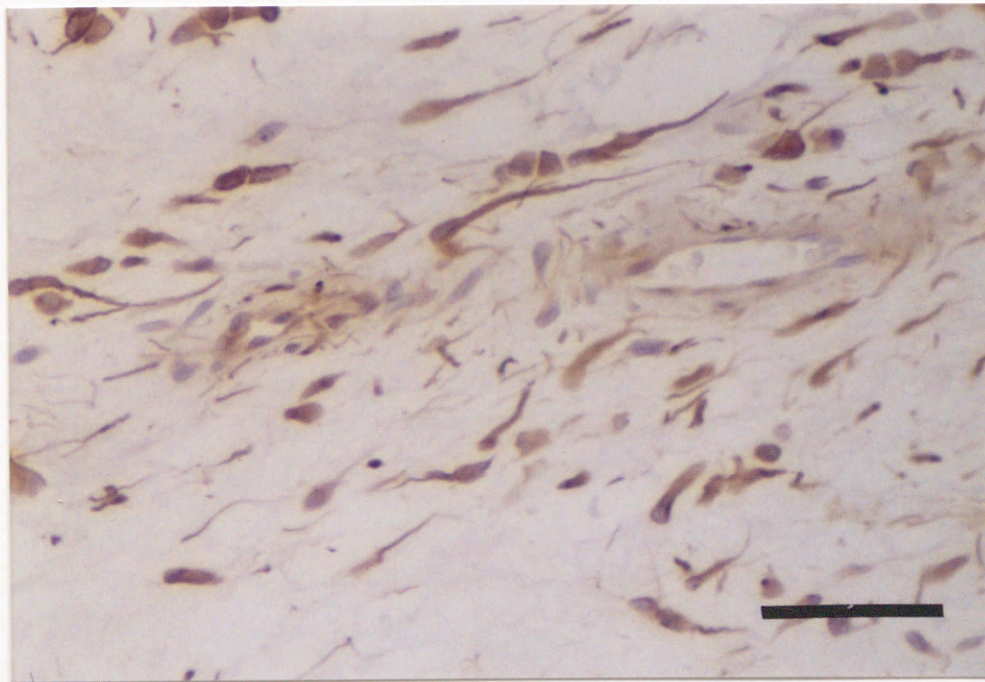
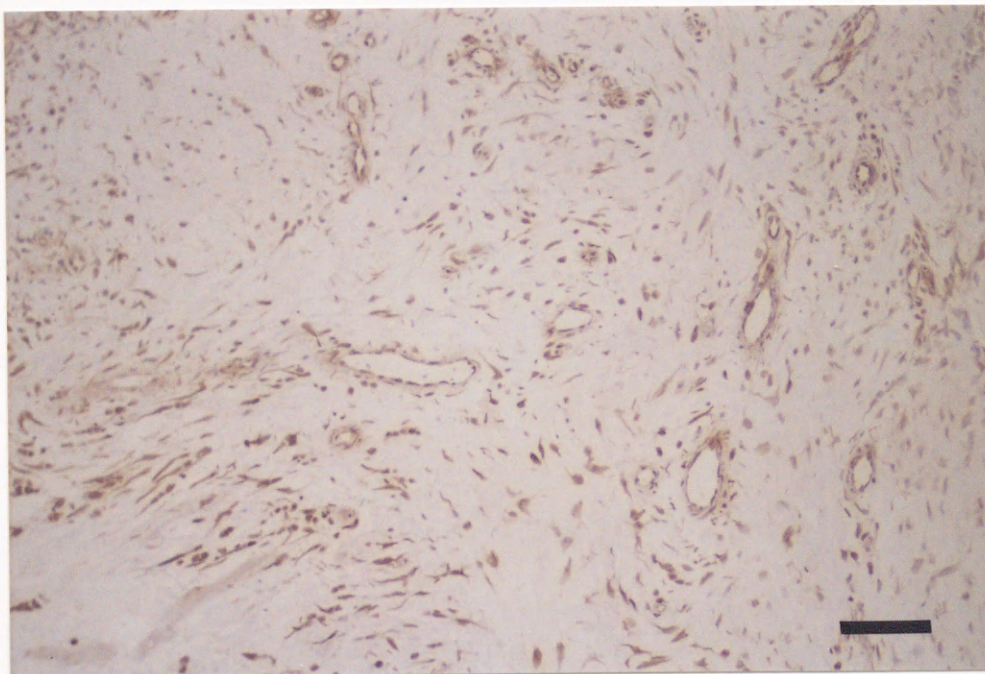


図3 炎症性肉芽組織、MMP-2

コラーゲン束中に存在する紡錘形細胞と、血管基底膜が陽性となっている。強拡大の形態から、前者は線維芽細胞と判断される。(barは写真上段が $100\mu\text{m}$ 、下段が $50\mu\text{m}$ )



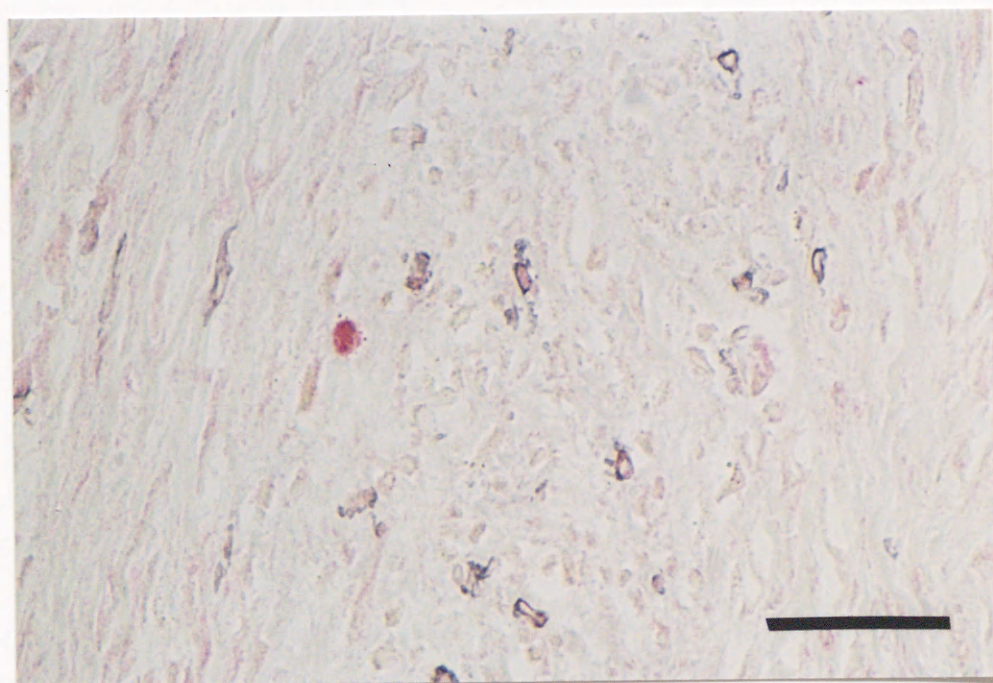
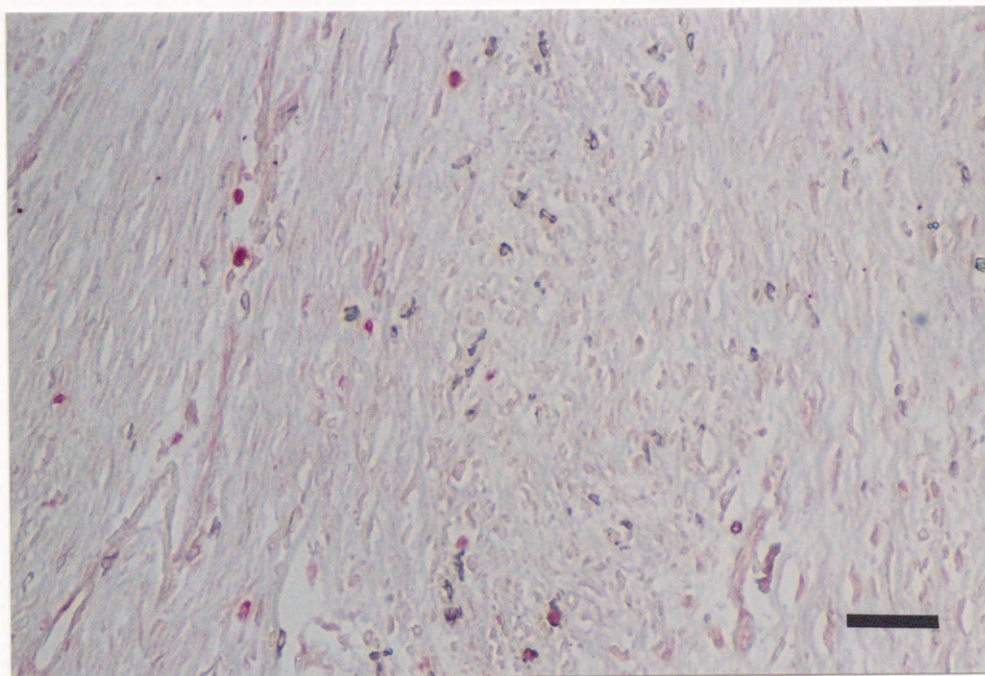


図4 デスモイド、二重染色（MMP-2：赤、LeuM5：黒青）

骨肉腫の例と異なり、二重陽性像を呈するマクロファージは少数である。MMP-2陽性細胞は線維芽細胞が主体となっている。（barは100  $\mu$  m）



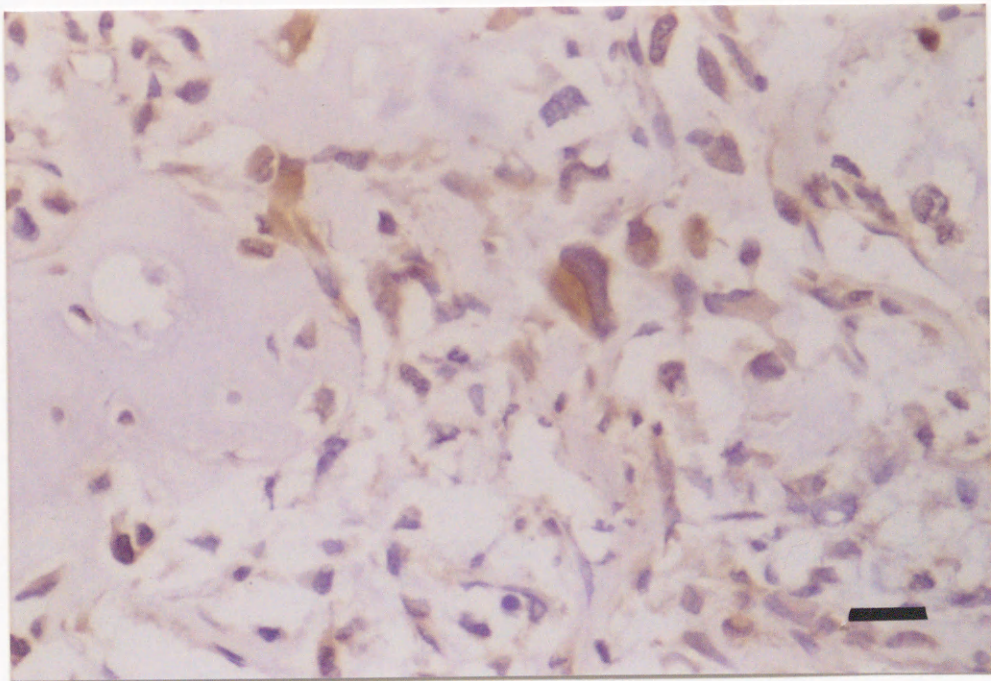
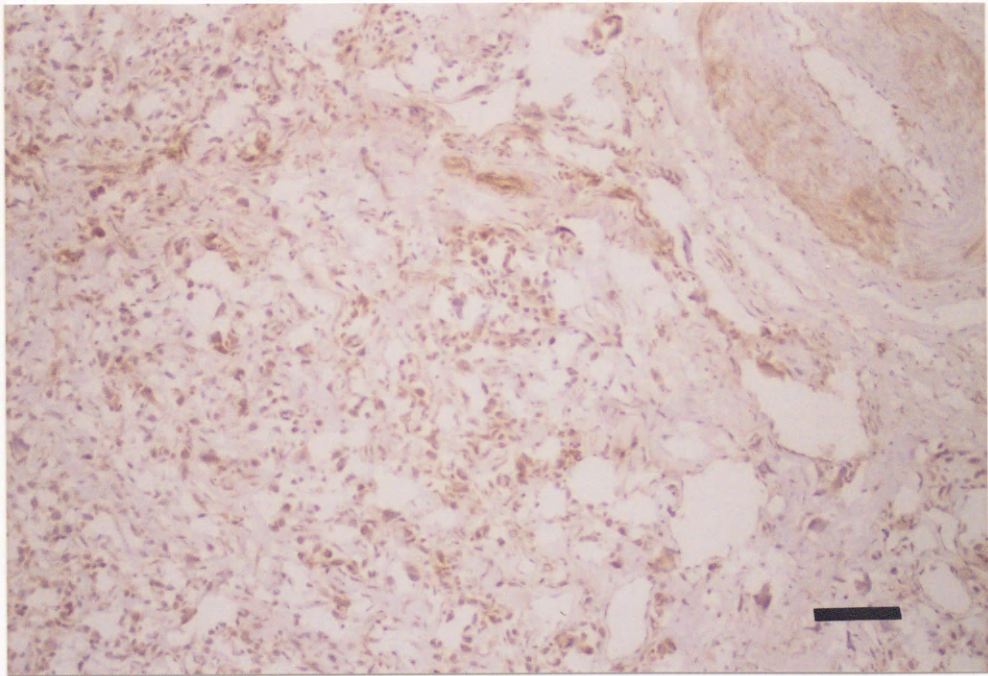


図5 骨肉腫、 MT-MMP (図1と同部位)

腫瘍中の細胞と、血管中膜平滑筋の一部に陽性像が得られる。核異型の明らかな肉腫細胞と、周囲の反応性と思われる小型の細胞とで、染色の強度の差はみられない。(barは写真上段が100  $\mu$ m、下段が10  $\mu$ m)



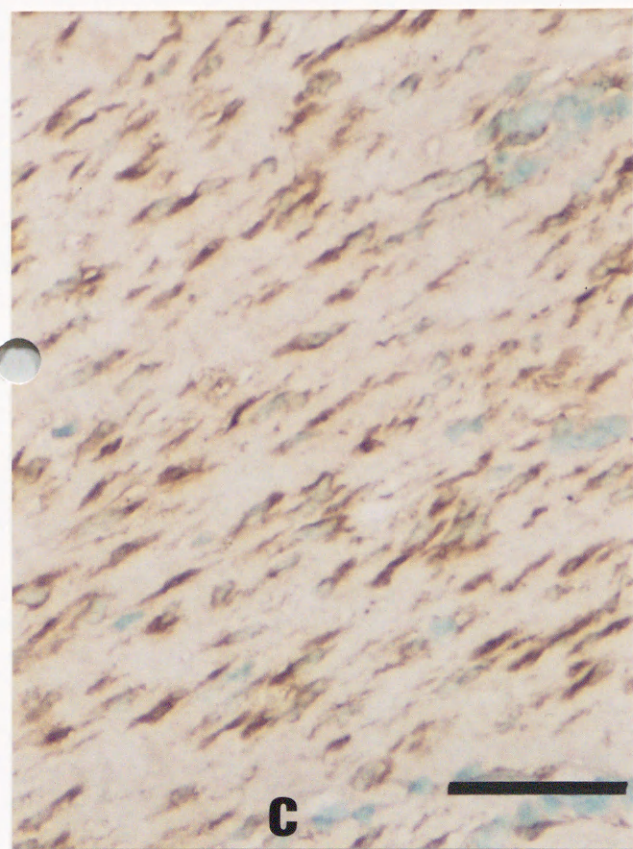
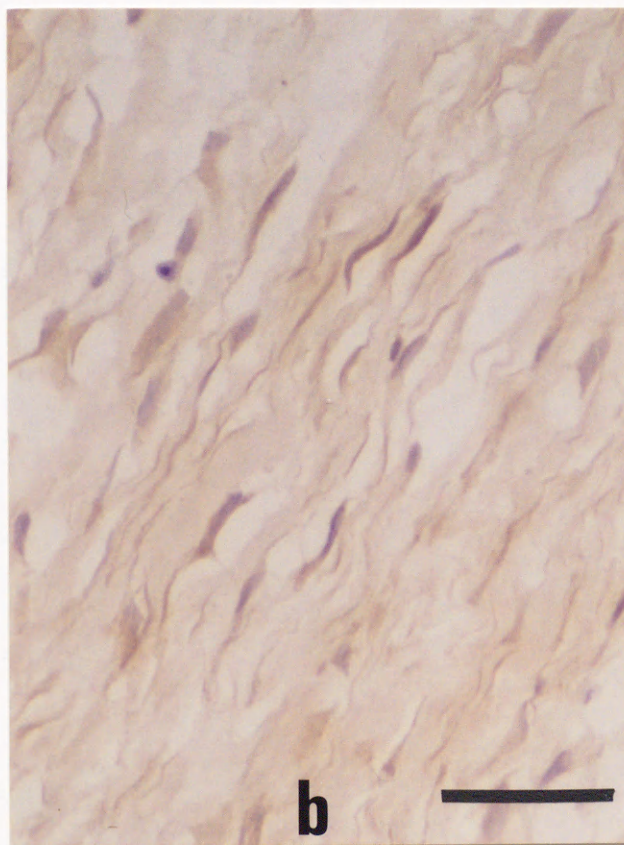
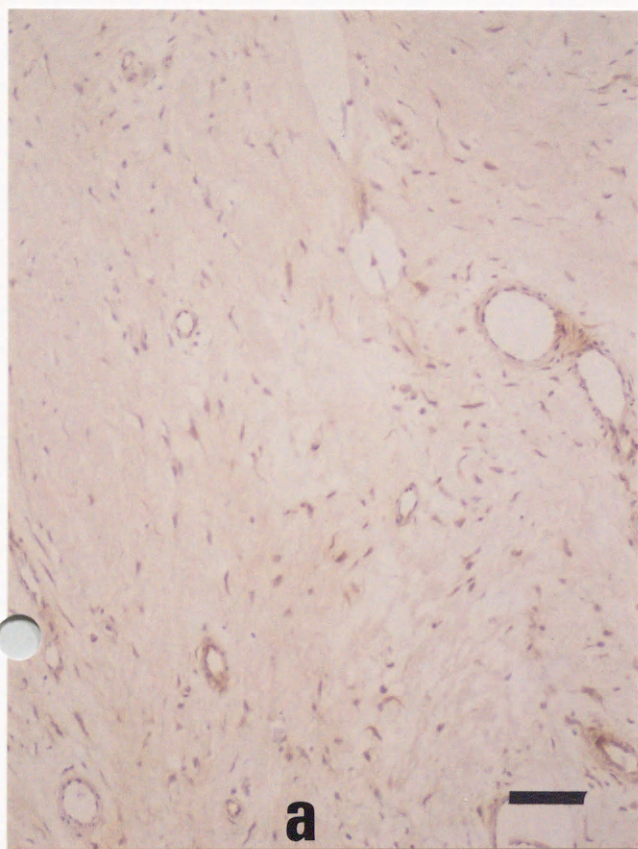


図6 炎症性肉芽組織

a、b：MT-MMPは、コラーゲン束中に存在する紡錘形細胞と、血管基底膜に陽性像が得られる。c：I型 procollagenは、コラーゲン束中に存在する紡錘形細胞に陽性像が得られる。MMP-2、MT-MMPの免疫染色の結果にはほぼ一致している点に注目。（barは50  $\mu$ m）



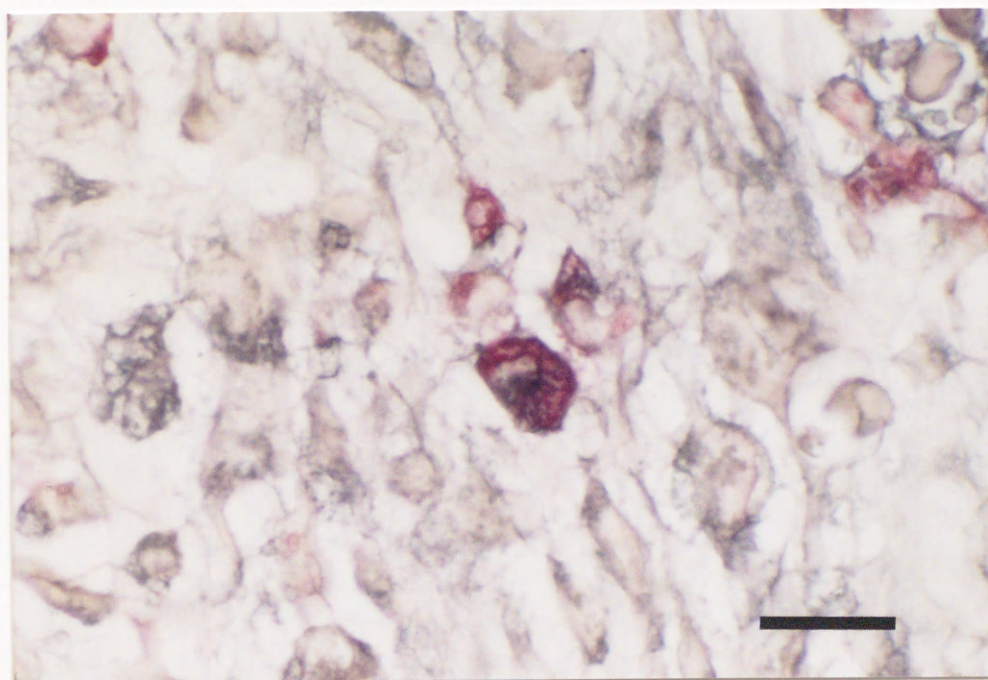
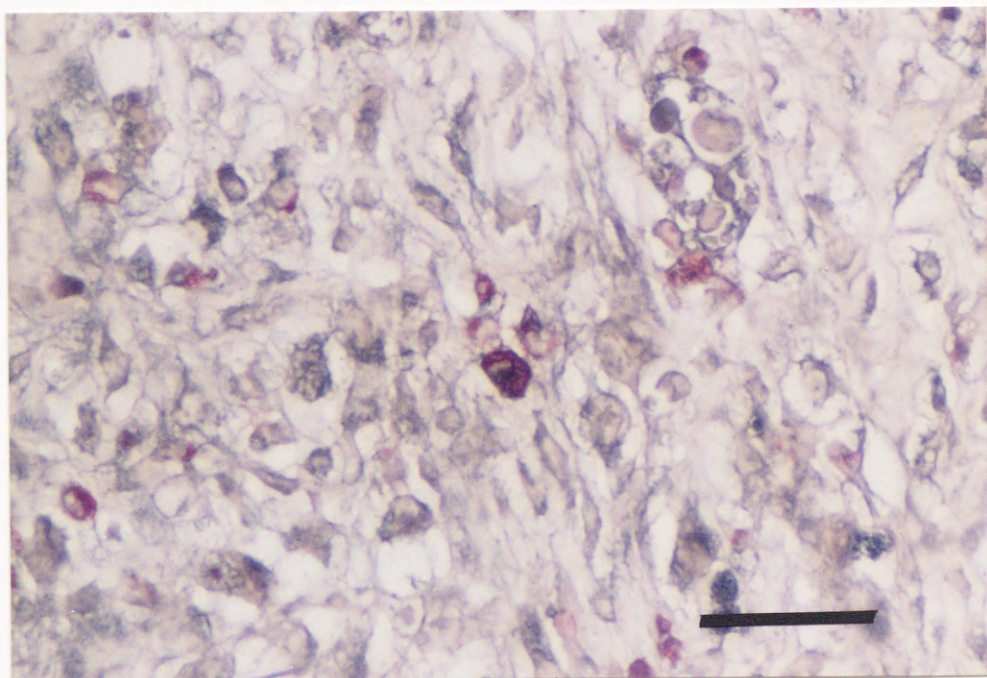


図7 骨肉腫、二重染色（CD68：赤、MT-MMP：灰青）

CD68陽性細胞（マクロファージ）の大部分がMT-MMP陽性となっている。（barは写真上段が $50\mu\text{m}$ 、下段が $20\mu\text{m}$ ）



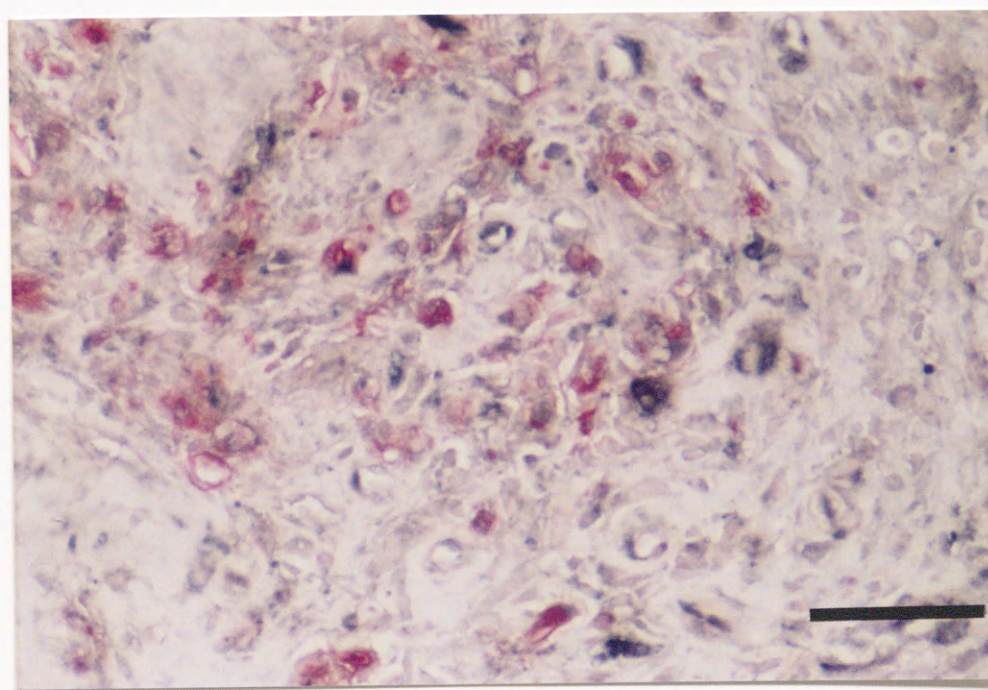
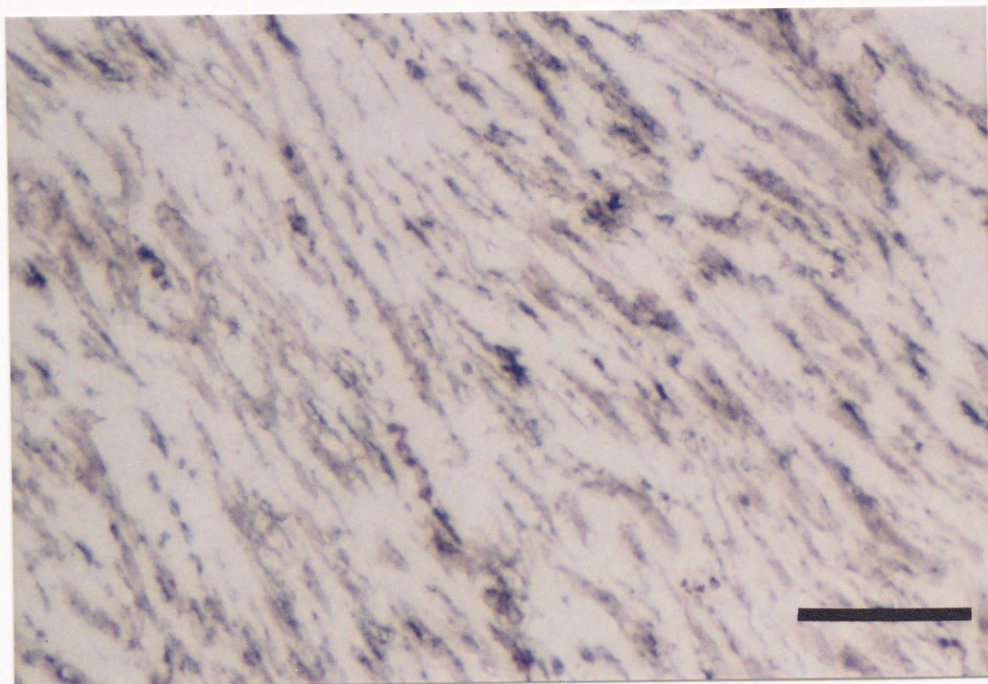


図8 炎症性肉芽組織、二重染色（CD68：赤、MT-MMP：灰青）

コラーゲンの増生の盛んな部位にはCD68陽性細胞（マクロファージ）は見られず（写真上段）、血管の新生の盛んな炎症巣には多数のマクロファージを認める（写真下段）。これらのマクロファージの中にはCD68との二重陽性像を呈するものも認められる。（barは50  $\mu$ m）



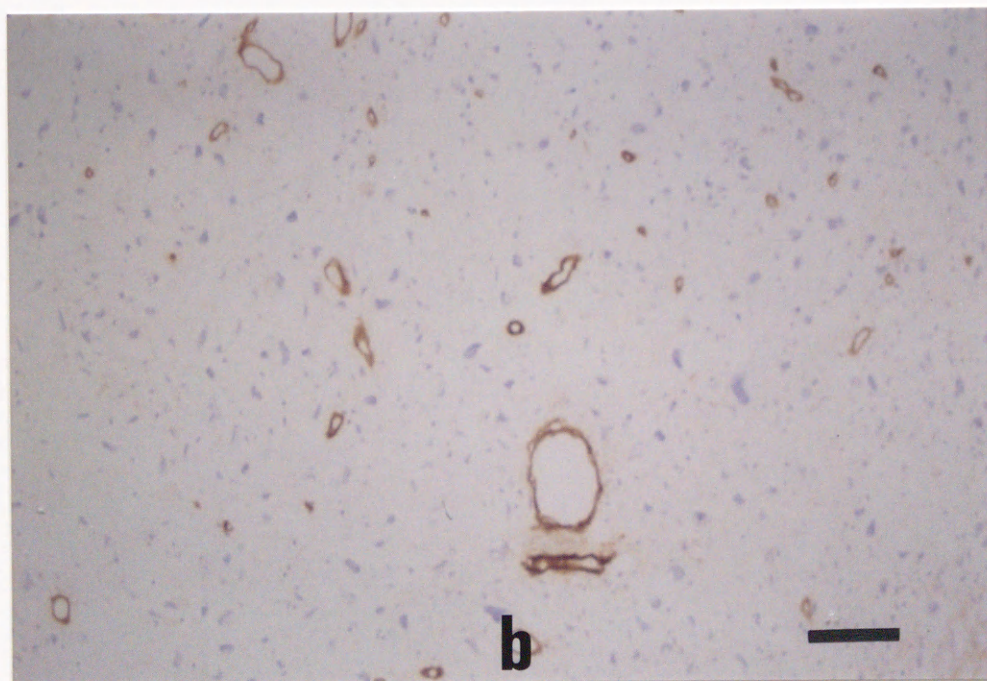
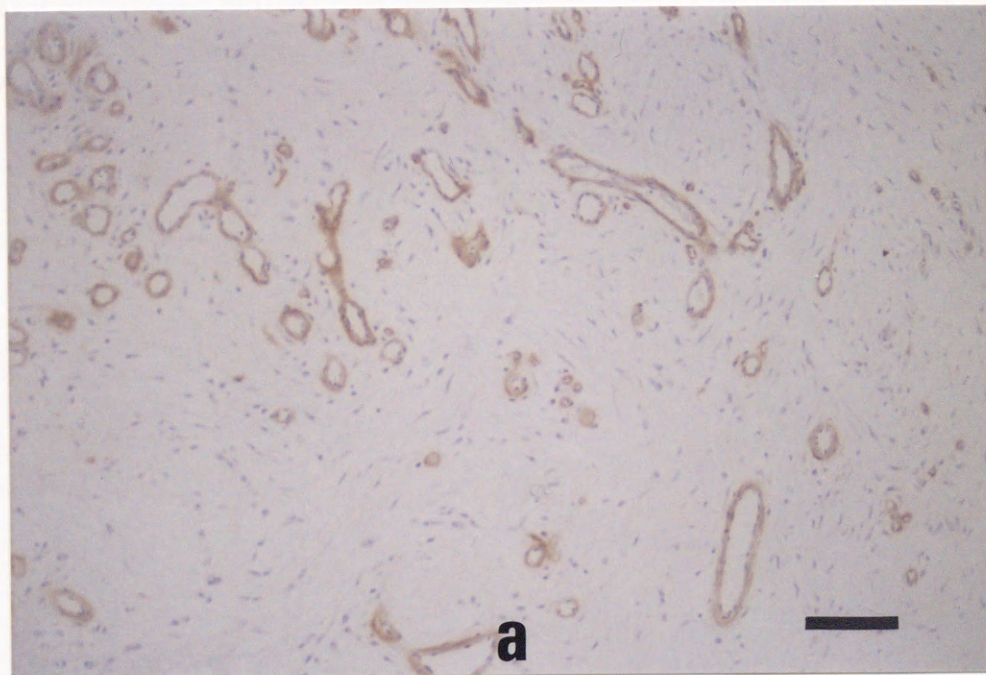


図9 type IV collagen

a: 炎症性肉芽組織、b: 骨肉腫ともに局在が血管基底膜に局限している。(barは100  $\mu$  m)



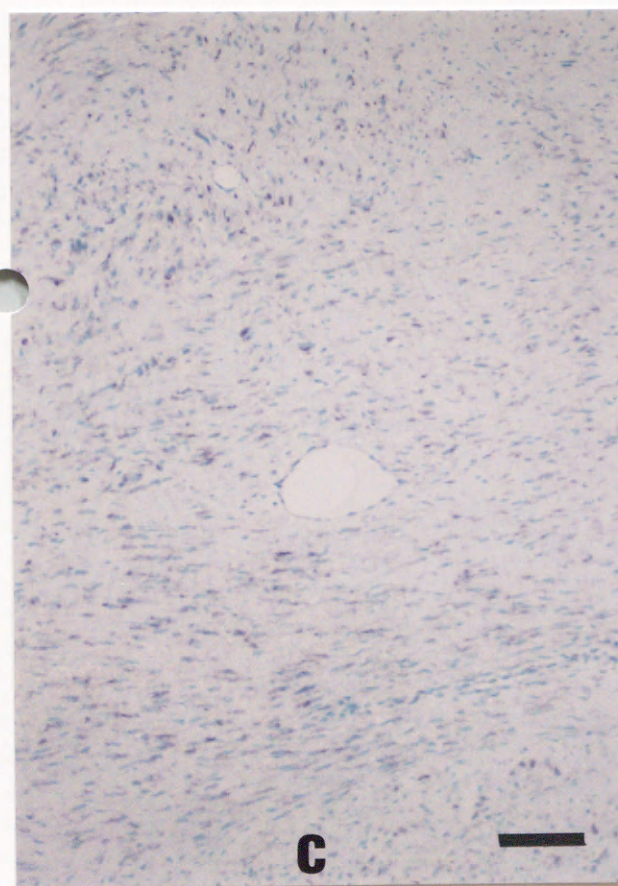
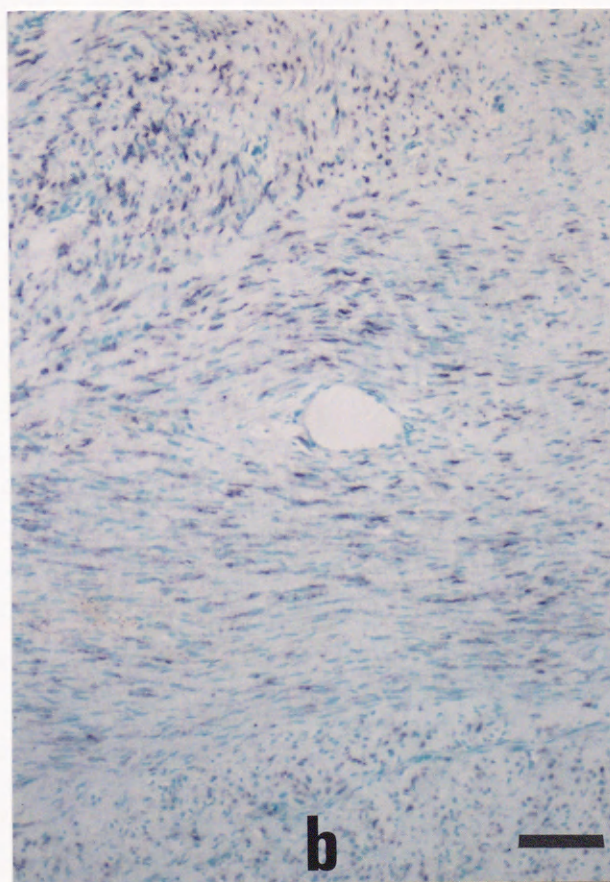
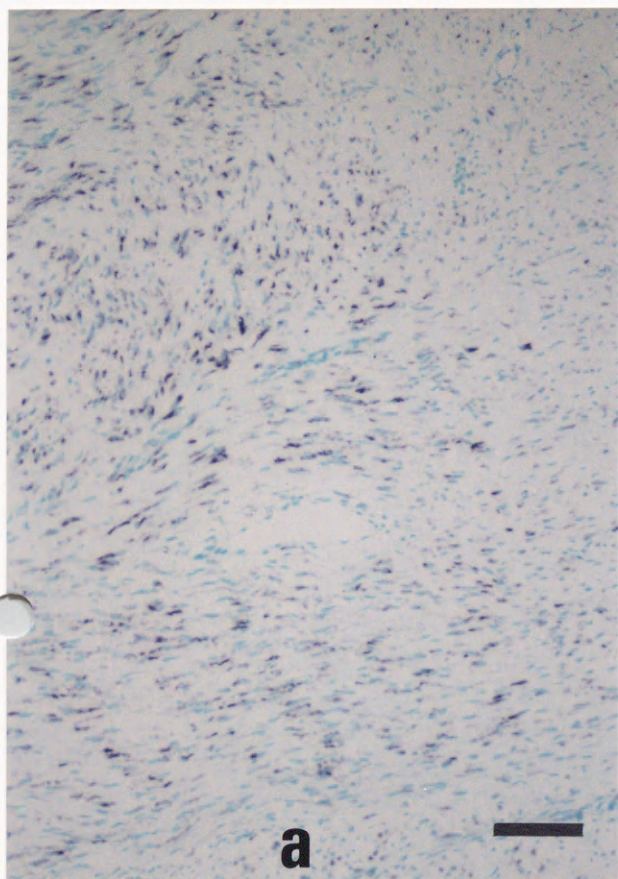


図10 炎症性肉芽組織、  
*in situ* hybridization

a:  $\alpha 1$  procollagenは、線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞にシグナルが認められる。b: MMP-2は、線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞と、血管内皮細胞の一部にシグナルが認められる。c: MT-MMPは、線維芽細胞と判断される紡錘形の細胞と、血管内皮細胞の一部にシグナルが認められる。a、b、cの結果が類似している点に注目。  
(barは100  $\mu$ m)



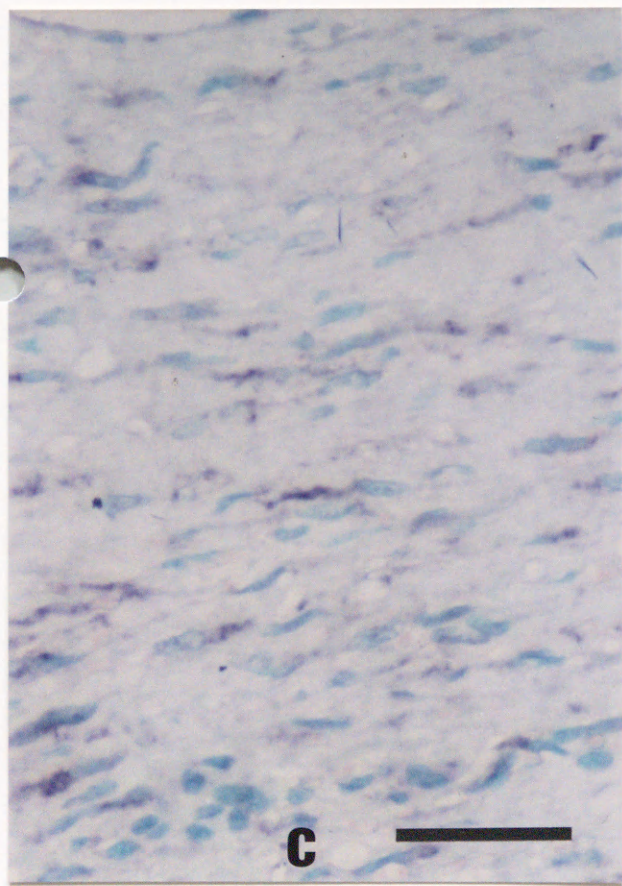
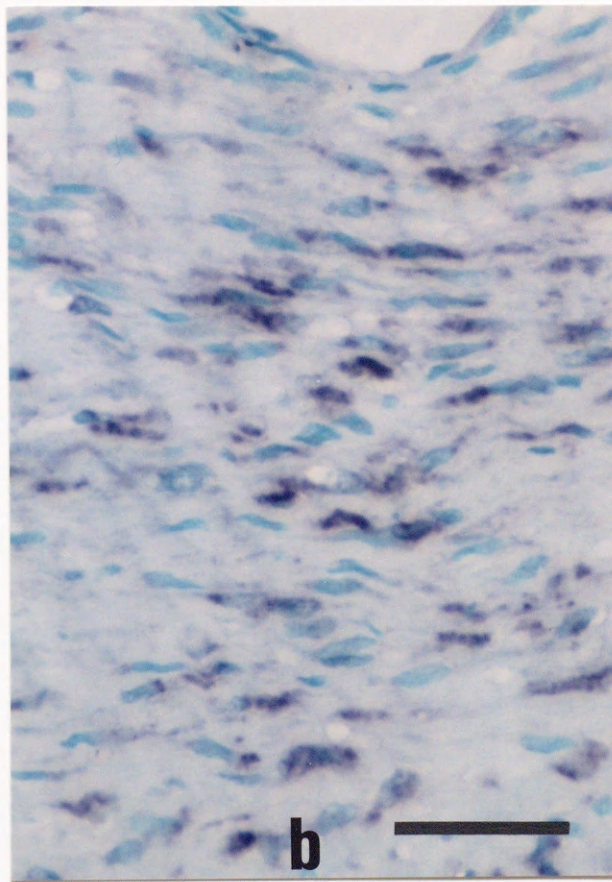
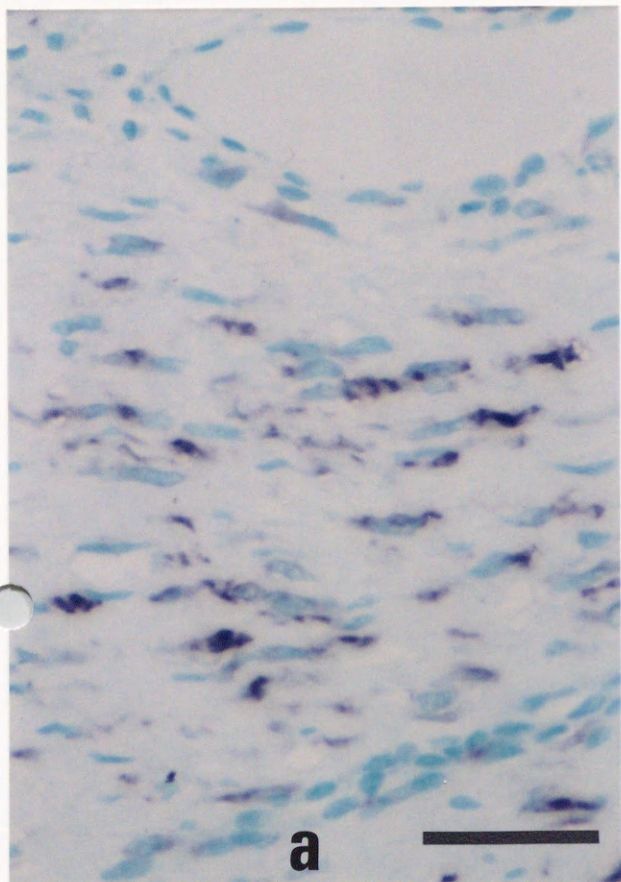


図11 図10の強拡大  
細胞の形態と分布の類似性がより明らかである。(barは  
50  $\mu$  m)



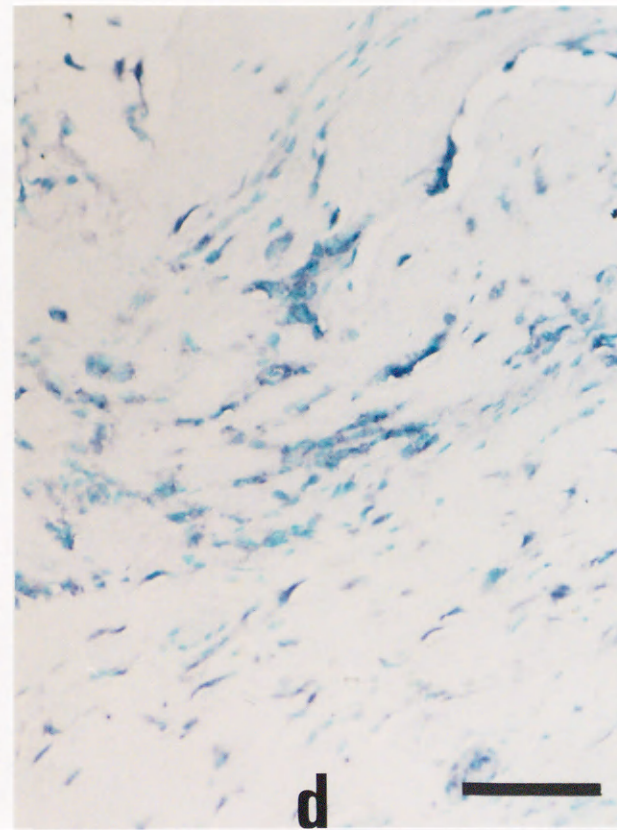
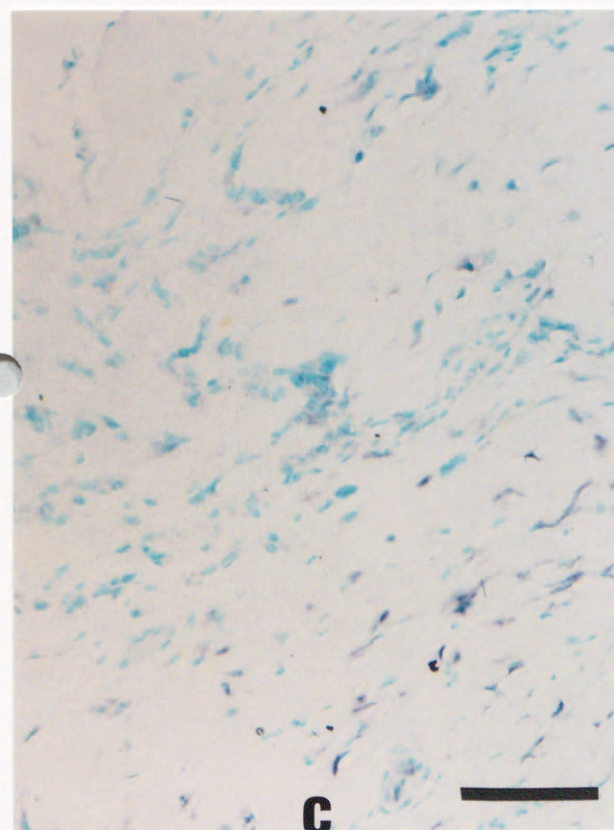
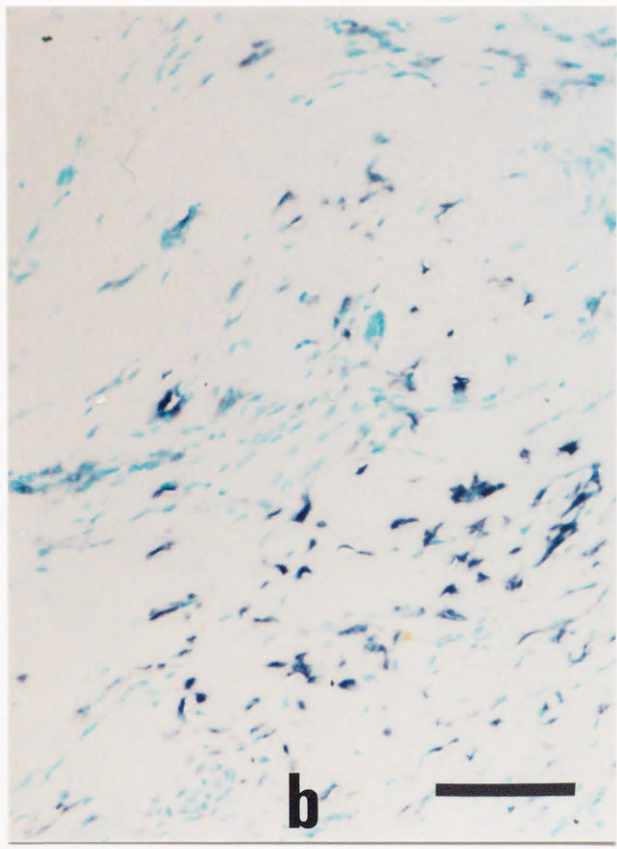
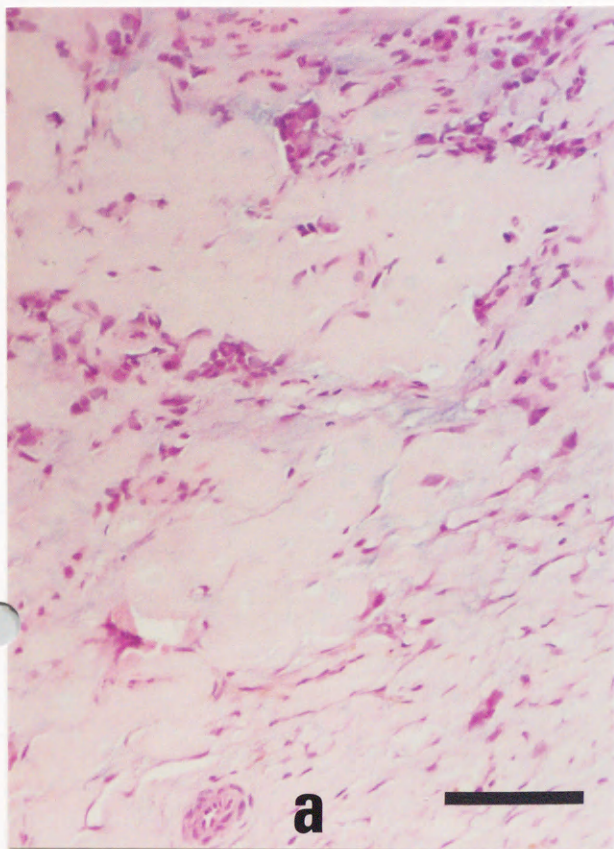


図12骨肉腫、*in situ* hybridization

a: HE染色による標本では、類骨形成と、異型性を伴って類骨を取り囲むように増殖する肉腫細胞が認められる。  
 b:  $\alpha$  1 procollagenのmRNAのシグナルは、類骨中の小型の細胞に認められる。肉腫細胞にはシグナルは認められない。  
 c: MMP-2のmRNAのシグナルは、類骨周辺の反応性細胞と判断される細胞と、血管内皮細胞の一部に認められる。肉腫細胞のシグナルは弱い。  
 d: MT-MMPのmRNAのシグナルは、肉腫細胞と、血管内皮細胞の一部に認められる。cとdの結果が逆である点に注目。(barは100  $\mu$  m)



表1 症例

悪性群	免疫染色症例		in situ hybridization症例	
	症例数	症例数	症例数	症例数
骨肉腫	17			2
悪性線維性組織球腫	19			1
脂肪肉腫	3			0
軟骨肉腫	1			1
小細胞肉腫	1			1
その他	6			0
コントロール群				
炎症性肉芽組織	11 <sup>*</sup>			1 <sup>**</sup>
デスマイド	5			2
その他	8			0

※人工関節置換後、褥瘡部 ※※褥瘡部



表2 使用抗体一覧

使用抗体名	使用濃度	入手先
抗ヒトtype IV collagen	1 : 200	大島章先生 (和歌山医科大学) より恵与
抗ヒトI型procollagen*	1 : 200	DAKO社
抗ヒトMMP-2(CA4001)	2.4 $\mu$ g/ml	Dr.Karl Tryggvason (Oulu, Finland) より恵与
抗ヒトMT-MMP (113-5B7)	5 $\mu$ g/ml	清木元治先生 (金沢大学がん研究所)、岩田和士先生 (富士薬品) より恵与
LeuM 5	1 : 2000	Beckton Dickinson社
CD 68	1 : 200	DAKO社

※抗ヒトI型procollagenのみラットモノクローナル抗体、他はマウスモノクローナル抗体



表3 ハイブリダイゼーション液調整

20mg/ml E.coli tRNA	50 $\mu$ l
1.0M Tris-HCl (pH8.0)	10 $\mu$ l
0.5M EDTA	2.5 $\mu$ l
X50 Denhart液	10 $\mu$ l
5M NaCl	30 $\mu$ l
脱イオン化フォルムアミド	250 $\mu$ l
50% dextran sulfate	100 $\mu$ l
DW	72.5 $\mu$ l

※全量を500  $\mu$  lとし、これに各プロローブをそれぞれ加える。



表4 免疫染色の結果

抗体	抗ヒトMMP-2 (CA4001)	抗ヒトMT-MMP (113-5B7)	抗ヒトI型 procollagen
悪性骨軟部腫瘍			
肉腫細胞	+	++	—
腫瘍浸潤マクロファージ	++	++	—
血管内皮細胞	±	±	—
コントロール病変			
線維芽細胞	++	++	++
マクロファージ	— ~±	± ~+	
血管内皮細胞	±	±	—



表5 *in situ* hybridizationの結果

プローブ	MMP-2	MT-MMP	$\alpha$ I procollagen
悪性骨軟部腫瘍（骨肉腫）			
肉腫細胞	+	++	—
腫瘍浸潤マクロファージ	++	+	—
血管内皮細胞	±	— ±	—
コントロール病変			
線維芽細胞	++	++	++
血管内皮細胞	±	±	—





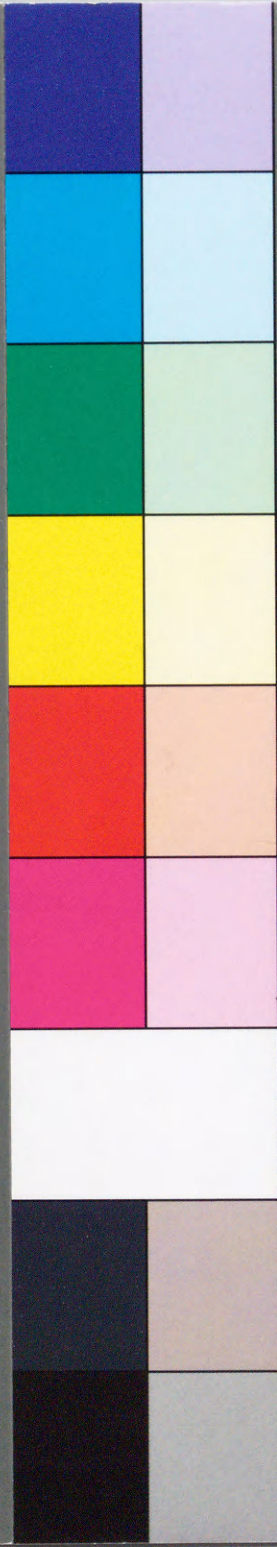


inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

